НАУЧНЫЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 582.273-113.2

**ПРОДУКЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
ПОЛУПРОТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ
PORPHYRIDIUM PURPUREUM (BORY) DREW ET ROSS
ПРИ НИЗКОЙ ОСВЕЩЁННОСТИ**

© 2022 г. **А. Б. Боровков¹, И. Н. Гудвилевич¹,
Т. М. Новикова¹, Е. В. Климова²**

¹ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,
Севастополь, Российская Федерация

²Орловский государственный университет имени И. С. Тургенева, Орёл, Российская Федерация
E-mail: gudirina2008@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.04.2020; после доработки 29.07.2020;
принята к публикации 24.12.2021; опубликована онлайн 22.03.2022.

Красная микроводоросль *Porphyridium purpureum* (Bory de Saint-Vincent, 1797) Drew et Ross, 1965 вызывает интерес у исследователей как источник разнообразных биологически ценных веществ, количество которых в её клетках определяется условиями культивирования. Содержание фикобилипротеинов в клетках *P. purpureum* непосредственно зависит от концентрации азота в культуральной среде и от уровня освещённости клеток. Полупроточный способ культивирования позволяет легко поддерживать эти параметры на заданном уровне. Целью работы было изучить рост культуры *P. purpureum*, накопление и продукцию пигмента В-фикоэритрина (В-ФЭ) при низкой поверхностной освещённости, когда скорости процессов фотодеструкции пигментов минимальны. *P. purpureum* выращивали методом полупроточного (квазинепрерывного) культивирования при удельной скорости протока среды 0,1 и 0,2 сут⁻¹ и средней поверхностной освещённости 5 и 25 Вт·м⁻². Продуктивность культуры *P. purpureum* увеличивалась в 1,6–1,7 раза как с ростом поверхностной освещённости с 5 до 25 Вт·м⁻², так и с увеличением удельной скорости протока среды с 0,1 до 0,2 сут⁻¹. Максимальные значения продуктивности для условий эксперимента (0,21 г·л⁻¹·сут⁻¹) отмечены в варианте с освещённостью 25 Вт·м⁻² и 20%-ной скоростью обмена среды, однако они были ниже расчётных в 1,5–2 раза. Содержание белка и В-ФЭ в клетках *P. purpureum* снижалось как с ростом поверхностной освещённости (на 15–20 %), так и с увеличением скорости обмена среды (в 1,5 раза) для всех вариантов. Изменения содержания белка и В-ФЭ в культуре *P. purpureum* также имели однонаправленный характер, и в основном он соответствовал характеру изменения плотности культуры *P. purpureum*. Продуктивность порфиридиума по В-ФЭ увеличивалась в 1,5–1,9 раза с ростом поверхностной освещённости с 5 до 25 Вт·м⁻². Максимальная продуктивность *P. purpureum* по В-ФЭ (13 мг·л⁻¹·сут⁻¹) зарегистрирована для вариантов эксперимента с поверхностной освещённостью 25 Вт·м⁻² (0,1 и 0,2 сут⁻¹). Повышение удельной освещённости клеток порфиридиума в эксперименте с 7 до 26 Вт·г⁻¹ вызывало увеличение продуктивности по биомассе в 2,6 раза, по В-ФЭ — в 1,8 раза, по белку — в 1,7 раза. Показано, что фактором, определявшим продукционные характеристики исследованной культуры в опыте, являлся световой, что подтверждено полученными экспериментальными данными.

Ключевые слова: *Porphyridium purpureum*, плотность культуры, белок, фикобилипротеины, В-фикоэритрин, продуктивность

Красную микроводоросль *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross часто рассматривают как объект лабораторного и массового культивирования (Дробецкая, 2005 ; Маркина и Айздайчер, 2019 ; Минюк и др., 2008 ; Цоглин и Пронина, 2013 ; Fabregas et al., 1998 ; Li S. et al., 2019). Получаемая биомасса микроводоросли может служить источником ряда ценных физиологически активных веществ — внеклеточных сульфополисахаридов, ненасыщенных жирных кислот, а также пигментов группы фикобилипротеинов (далее — ФБП) (Біохімія червоних водоростей, 2007 ; Стадничук, 1990 ; Borowitzka, 1995 ; Fabregas et al., 1998 ; Li T. et al., 2019). Специфический состав пигментов *P. purpureum* обусловлен обитанием этого вида в море: зелёный свет проникает на большие глубины и поглощается В-фикоэритрином (далее — В-ФЭ), входящим в состав светособирающего комплекса хлоропластов (Стадничук, 1990 ; Algarra & Ruediger, 1993 ; John et al., 1984).

ФБП порфиридиума (В-ФЭ, R-фикоцианин и аллофикоцианин), входящие в состав фотосистемы II, являются пигментами белковой природы; их количество в клетках определяют уровни освещённости и обеспеченности биогенными элементами, в первую очередь азотом. В прикладном аспекте наибольший интерес вызывает красный пигмент В-ФЭ. Его водный раствор имеет красивую розовую окраску и ярко выраженную оранжевую флуоресценцию, а белковая природа пигмента и отсутствие сведений о токсичности открывают широкие перспективы для его использования в пищевой, косметической и медицинской промышленности. Количество В-ФЭ может составлять до 85 % от общей суммы ФБП. Относительное содержание В-ФЭ и его продукция варьируют в достаточно широком диапазоне в зависимости от условий культивирования *P. purpureum*; значение может достигать 40–50 мг·л⁻¹·сут⁻¹ (Fabregas et al., 1998 ; Fuentes-Grunewald et al., 2015 ; Gudvilovich & Borovkov, 2014 ; Kathiresan et al., 2006).

Интенсивность света является одним из критических факторов, влияющих на количественный состав пигментов микроводорослей. По литературным данным, микроводоросли, имеющие фикобилисомы и ФБП в пластидах, как правило, лучше растут при низкой освещённости (~ 10–50 моль фотонов·м⁻²·с⁻¹), в то время как другие виды водорослей, например динофлагелляты или зелёные, обычно нуждаются в более высокой интенсивности света (~ 60–100 моль фотонов·м⁻²·с⁻¹) (Біохімія червоних водоростей, 2007 ; Стадничук, 1990 ; Algarra & Ruediger, 1993 ; John et al., 1984 ; Sosa-Hernández et al., 2019). Замедление скорости роста клеток *P. purpureum* в случае избыточной освещённости часто связывают с разрушением хлоропластов, которое вызвано воздействием высокой интенсивности света и инактивацией ферментов, участвующих в процессах фиксации CO₂ (Стадничук, 1990 ; Falkowski & Owens, 1980). При снижении уровня облучённости количество ФБП, и в первую очередь В-ФЭ, в клетках *P. purpureum* значительно увеличивается (Стадничук, 1990 ; Тренкеншу и др., 1981 ; Algarra & Ruediger, 1993 ; John et al., 1984 ; Velea et al., 2011).

Показано (Fabregas et al., 1998 ; Fuentes-Grunewald et al., 2015 ; Gudvilovich & Borovkov, 2014), что содержание В-ФЭ в клетках *P. purpureum* зависит от концентрации азота в культуральной среде и резко снижается после исчерпания этого элемента минерального питания.

При сравнении скорости роста и продукции биомассы, экзополисахаридов и В-ФЭ в накопительной и полупроточной культуре *P. purpureum* было отмечено преимущество последней по всем анализируемым характеристикам (Fuentes-Grunewald et al., 2015 ; Gudvilovich & Borovkov, 2014). Именно поэтому культивирование порфиридиума для получения биомассы, обогащённой ФБП, целесообразно осуществлять в полупроточном режиме: он позволяет легко поддерживать на заданном уровне как освещённость культуры, так и концентрацию азота. Тем не менее даже при таком способе выращивания варьирование параметров культивирования (скорости протока среды

и освещённости) значительно меняет метаболизм и направленность биосинтетических процессов в культуре *P. purpureum* (Упитис и др., 1989 ; Fabregas et al., 1998 ; Fuentes-Grunewald et al., 2015 ; Gudvilovich & Borovkov, 2014).

Влияние освещённости и концентрации азота на рост и накопление ФБП у *P. purpureum* изучено достаточно хорошо, однако в основном воздействие этих параметров оценено по отделимости. Кроме того, большинство исследований влияния света и концентрации азота на синтез В-ФЭ в клетках *P. purpureum* проведено для накопительных культур; данные по продуктивности полупроточных культур порфиридиума при варьировании этих параметров немногочисленны (Fabregas et al., 1998 ; Fuentes-Grunewald et al., 2015 ; Gudvilovich & Borovkov, 2014). Именно поэтому целью работы было изучить рост *P. purpureum*, накопление и продукцию В-ФЭ в полупроточной культуре при низкой поверхностной освещённости, когда скорости процессов фотодеструкции пигментов минимальны.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на базе отдела биотехнологий и фиторесурсов ФИЦ ИнБЮМ (г. Севастополь). Объектом исследования была культура красной микроводоросли *Porphyridium purpureum* (Bory de Saint-Vincent, 1797) Drew et Ross, 1965 (синоним: *Porphyridium cruentum* (S. F. Gray) Nägeli, 1894) (Rhodophyta), штамм IBSS-70 из «Коллекции гидробионтов Мирового океана» научно-образовательного центра коллективного пользования ФИЦ ИнБЮМ. Культуру выращивали на питательной среде для морских красных водорослей по (Тренкеншу и др., 1981). Состав (г·л⁻¹): NaNO₃ — 1,2; NaH₂PO₄×2H₂O — 0,45; EDTA-Na₂ — 0,037; FeC₆H₅O₇×3H₂O — 0,0265; MnCl₂×4H₂O — 0,004; Co(NO₃)₂×6H₂O — 0,0031; (NH₄)₆Mo₇O₂₄×4H₂O — 0,0009; K₂Cr₂(SO₄)₂×4H₂O — 0,0017. Среду готовили на стерилизованной морской воде.

Культуру *P. purpureum* выращивали в установке, которая состояла из четырёх фотобиореакторов, системы подачи газовой смеси, термостабилизирующей системы и системы освещения. Каждый фотобиореактор представлял собой стеклянную ёмкость размером 5 см × 25 см × 50 см (плоскопараллельный тип) с рабочей толщиной 5 см. Фотобиореакторы были изготовлены специалистами отдела биотехнологий и фиторесурсов ФИЦ ИнБЮМ. В газораспределительную систему с помощью системы дозирования (ротаметр) подавали углекислый газ из баллона; процентное содержание углекислоты в смеси составляло 2–3 % v/v (volume percent). Полученная газовоздушная смесь поступала в фотобиореактор, и таким образом осуществлялось перемешивание культуры. Средняя скорость продувки газовой смеси — 0,5 л·мин⁻¹·л⁻¹ культуры. На протяжении всего эксперимента рН среды поддерживали на уровне 8–9, температуру — +26...+28 °С. В качестве осветителя использовали лампы ДРЛ-700; средняя поверхностная освещённость составляла для двух культиваторов 5 Вт·м⁻² и ещё для двух — 25 Вт·м⁻².

P. purpureum выращивали методом полупроточного (квазинепрерывного) культивирования, удельная скорость потока среды в экспериментальных культиваторах составляла 0,1 и 0,2 сут⁻¹. Полупроточную (квазинепрерывную) культуру получали путём периодической замены части суспензии микроводоросли равноценным объёмом свежеприготовленной среды. Так, каждые 24 ч из культиваторов отбирали и заменяли 10 или 20 % культуры по объёму ($\omega = 0,1$ сут⁻¹ и $\omega = 0,2$ сут⁻¹ соответственно). Инокулят вносили в культиваторы с таким расчётом, чтобы начальная плотность во всех вариантах опыта была одинаковой. Содержание сухого вещества в культуре определяли объёмно-весовым (Тренкеншу и Беянин, 1979) и весовым методами (Методы физиолого-биохимического исследования, 1975). Продуктивность *P. purpureum* рассчитывали по ежедневным отборам культуры (10 и 20 % от объёма культиватора соответственно). Пробы для определения содержания пигментов и белка отбирали при достижении культурой стационарного динамического равновесия.

Суспензию культуры *P. purpureum*, полученную в эксперименте, центрифугировали в течение 10 минут, надосадочную жидкость сливали, осадённую биомассу использовали для определения ФБП. Содержание В-ФЭ определяли спектрофотометрическим методом (Стадничук, 1990), а белка — по Лоури (Lowry et al., 1951). Для количественного определения В-ФЭ в биомассе *P. purpureum* проводили её экстракцию фосфатным буфером (0,05 М; рН 7–7,5). Спектры экстрактов пигментов промеряли на регистрирующем спектрофотометре СФ-2000 в диапазоне длин волн 400–800 нм с шагом 0,1 нм. Регистрировали оптическую плотность полученных экстрактов в области характеристических максимумов поглощения В-ФЭ (545 нм), R-фикоцианина (615 нм) и аллофикоцианина (650 нм), а также при 750 нм (для учёта неспецифического поглощения раствора). Концентрацию пигментов в водном экстракте рассчитывали по (Стадничук, 1990), используя значения оптической плотности для соответствующих длин волн.

Определяли среднее арифметическое (\bar{x}), стандартное отклонение (SD), основную ошибку среднего и доверительный интервал для среднего ($\Delta\bar{x}$). Все расчёты проводили в LibreOffice и SciDAVis для уровня значимости $\alpha = 0,05$. В таблице и на графиках представлены средние значения и рассчитанные доверительные интервалы ($\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$) для трёх повторностей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При полупроточном выращивании плотность культуры *P. purpureum* стабилизировалась в соответствии с заданными параметрами освещённости и ежесуточного обмена среды. Стационарное динамическое равновесие устанавливалось на 3–4-е сутки (рис. 1А).

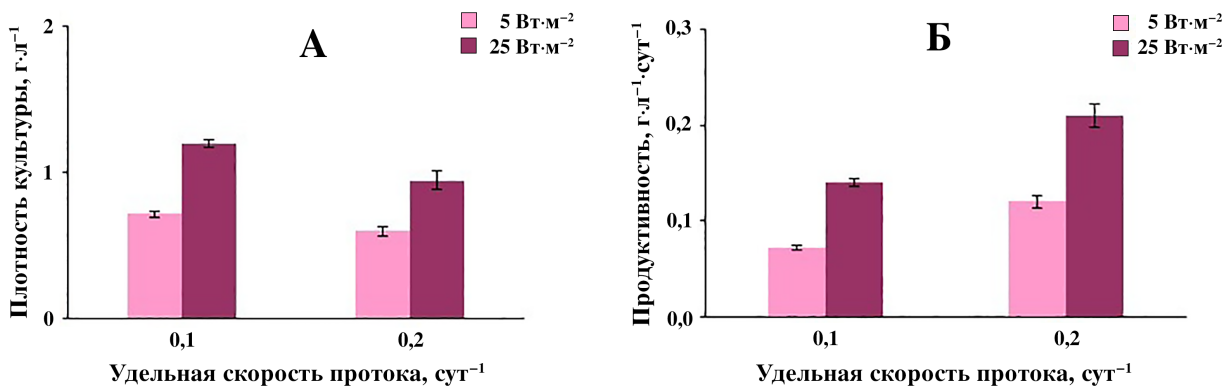


Рис. 1. Плотность (А) и продуктивность (Б) полупроточной культуры *P. purpureum* при различной освещённости

Fig. 1. *P. purpureum* semi-continuous culture density (А) and productivity (Б) under different irradiance conditions

Питательная среда, которая была использована в опыте, рассчитана на получение 3–4 г биомассы микроводоросли *P. purpureum* с 1 л культуры (Тренкеншу и др., 1981 ; Упитис и др., 1989). С повышением удельной скорости протока среды с 0,1 до 0,2 сут⁻¹ происходило пропорциональное увеличение (в 2 раза) количества биогенных элементов, поступающих ежесуточно в культуру *P. purpureum*; соответственно, возрастала и ожидаемая продуктивность (табл. 1).

При увеличении скорости протока в 2 раза (с 0,1 до 0,2 сут⁻¹) плотность культуры *P. purpureum* снижалась для освещённости 5 и 25 Вт·м⁻² на 12 и 20 % соответственно (рис. 1А). С увеличением поверхностной освещённости плотность культуры возрастала: при ежесуточном обмене 10 % — в 1,8 раза, при 20 % — в 1,6 раза (рис. 1А). Что касается продуктивности культуры *P. purpureum*, то она увеличивалась в 1,6–1,7 раза как с ростом поверхностной освещённости с 5 до 25 Вт·м⁻², так и с повышением удельной скорости протока среды с 0,1 до 0,2 сут⁻¹ (рис. 1Б).

Таблица 1. Продуктивность *P. purpureum* при полупроточном культивировании

Table 1. *P. purpureum* productivity under semi-continuous cultivation

Удельная скорость протока, сут ⁻¹	Количество ежесуточно вносимого азота, мг·л ⁻¹	Предполагаемая продуктивность, г·л ⁻¹ ·сут ⁻¹	Наблюдаемая продуктивность, г·л ⁻¹ ·сут ⁻¹
0,1	19,8	0,3–0,4	0,07–0,14
0,2	39,6	0,6–0,8	0,12–0,21

Следует отметить, что наблюдаемая продуктивность культуры *P. purpureum* не достигала расчётных значений ни в одном из вариантов эксперимента. Максимальные значения были отмечены в варианте с самой высокой освещённостью и скоростью обмена среды, однако и они были ниже расчётных в 1,5–2 раза. Для других вариантов наблюдаемая продуктивность была ниже расчётной в 2,5–4 раза (см. табл. 1, рис. 1Б).

При увеличении скорости протока среды с 0,1 до 0,2 сут⁻¹ и снижении плотности культуры *P. purpureum* удельная освещённость клеток возрастала для всех вариантов. Это привело к существенному повышению продуктивности порфиридиума, что свидетельствует о лимитировании роста культуры именно световыми условиями. Таким образом, скорость роста *P. purpureum* определялась не количеством биогенных элементов, поступающих при ежесуточном обмене, а уровнем освещённости клеток культуры.

Кроме стабилизации плотности культуры *P. purpureum*, при полупроточном выращивании наблюдалась и стабилизация содержания В-ФЭ в ней (рис. 2Б). Это объясняется низкой вариабельностью концентрации элементов минерального питания и освещённости клеток при достижении культурой состояния стационарного динамического равновесия (Тренкеншу, 2017). Содержание В-ФЭ в клетках *P. purpureum* снижалось как с ростом поверхностной освещённости (на 15 %), так и со снижением плотности культуры (с увеличением скорости обмена среды) (в 1,5 раза) для всех вариантов (рис. 2А). По-видимому, существенный рост плотности культуры в условиях увеличившейся с 5 до 25 Вт·м⁻² освещённости нивелировал воздействие светового фактора на процессы фотоакклимации в клетках микроводоросли, поэтому изменение содержания В-ФЭ было менее выраженным. Характер изменения содержания и продукции В-ФЭ в культуре *P. purpureum* при увеличении освещённости и скорости протока среды в основном соответствовал характеру изменения плотности культуры и её продуктивности (рис. 1, 2Б, 2В). Так, содержание В-ФЭ в культуре увеличивалось в 1,5–1,9 раза с повышением поверхностной освещённости с 5 до 25 Вт·м⁻² и снижалось в 1,6–2 раза с увеличением скорости роста. Продуктивность порфиридиума по В-ФЭ также возрастала в 1,5–1,9 раза с ростом поверхностной освещённости. С повышением удельной скорости протока среды с 0,1 до 0,2 сут⁻¹ продуктивность *P. purpureum* по В-ФЭ увеличивалась в 1,25 раза при освещённости 5 Вт·м⁻² и не изменялась при 25 Вт·м⁻².

Известно, что продукция ФБП зависит как от скорости роста культуры, так и от содержания этих пигментов в клетках микроводоросли (Fabregas et al., 1998 ; Gudvilovich & Borovkov, 2014). Наибольшая продуктивность полупроточной культуры *P. purpureum* по В-ФЭ зарегистрирована для вариантов эксперимента с поверхностной освещённостью 25 Вт·м⁻² (0,1 и 0,2 сут⁻¹). Показано, что повышение поверхностной освещённости в 5 раз для двух вариантов ежесуточного обмена приводило к значительному возрастанию как содержания В-ФЭ в культуре *P. purpureum*, так и продуктивности по этому пигменту. В то же время повышение удельной скорости протока среды с 0,1 до 0,2 сут⁻¹ оказывало менее выраженный эффект на данный параметр при 5 Вт·м⁻², а при поверхностной освещённости 25 Вт·м⁻² оно не приводило к заметному изменению продуктивности порфиридиума по В-ФЭ.

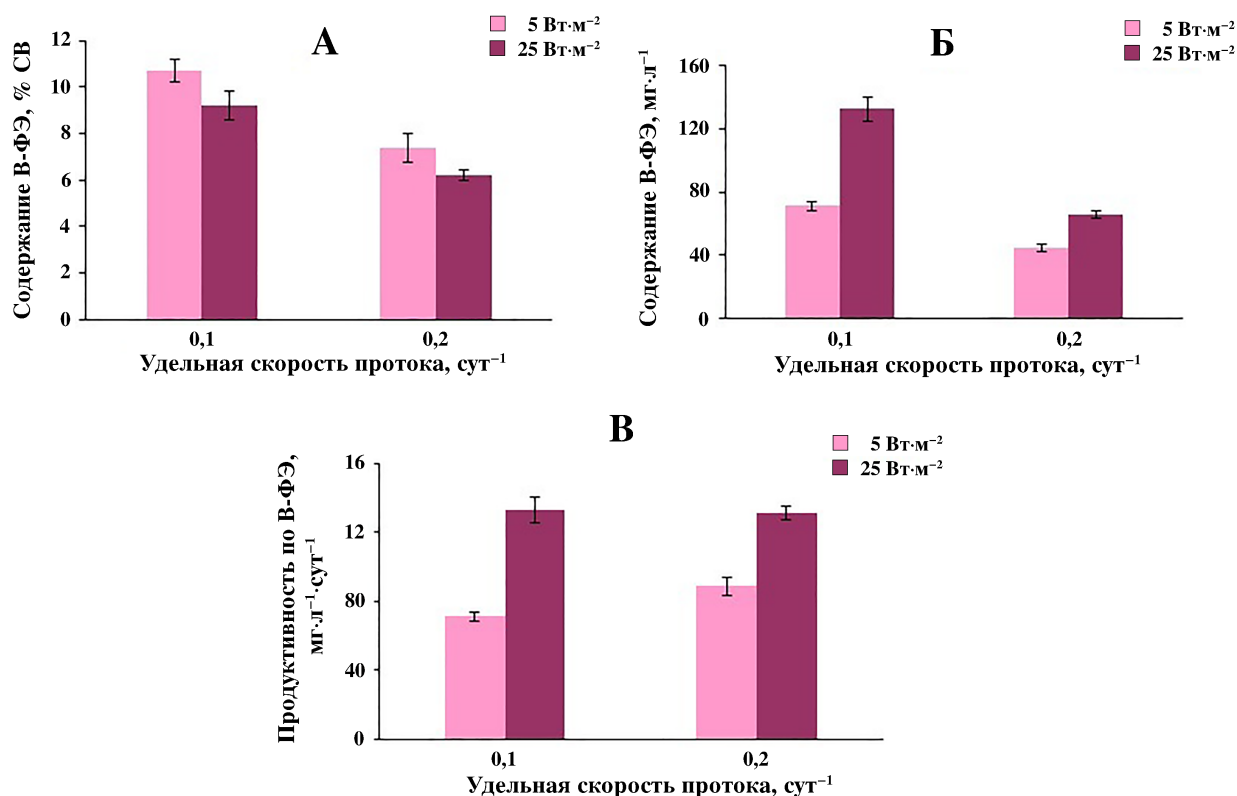


Рис. 2. Содержание В-фикоэритрина в биомассе (А) и культуре *P. purpureum* (Б), продуктивность полупроточной культуры *P. purpureum* по В-фикоэритрину (В) при различной освещённости

Fig. 2. B-phycoerythrin content in *P. purpureum* biomass (А) and culture (Б), as well as B-phycoerythrin productivity of *P. purpureum* semi-continuous culture (В) under different irradiance conditions

В работе (Fabregas et al., 1998) при сопоставимом уровне суммарной суточной облучённости клеток *P. purpureum* было показано, что содержание В-ФЭ в культуре отражает смену лимитирующих факторов. До скорости протока среды 0,1 сут⁻¹ этим фактором является азотное обеспечение, что выражается в увеличении содержания ФБП, а при дальнейшем повышении скорости протока среды — только световые условия в культуре, которые полностью контролируют клеточный метаболизм. В последнем случае с ростом скорости протока среды содержание В-ФЭ в культуре заметно снижается. Эта обратная зависимость между уровнем освещённости и содержанием В-ФЭ в клетках характерна как для *P. purpureum*, так и для других видов Rhodophyta.

Таким образом, повышение удельной скорости протока среды в эксперименте с 0,1 до 0,2 сут⁻¹ при поверхностной освещённости 25 Вт·м⁻² приводило к росту продуктивности по биомассе и к снижению содержания В-ФЭ в клетках *P. purpureum*. В итоге изменение относительного содержания не оказало выраженного влияния на продукцию В-ФЭ, так как компенсировалось повышением скорости роста культуры.

Что касается содержания белка в клетках *P. purpureum*, то оно уменьшалось на 15–20 % с ростом поверхностной освещённости с 5 до 25 Вт·м⁻² и сокращалось в 1,3–1,4 раза с увеличением удельной скорости протока среды с 0,1 до 0,2 сут⁻¹ (рис. 3А). В целом характер изменения содержания белка в культуре *P. purpureum* коррелировал с направленностью изменения содержания В-ФЭ. Эта тенденция соответствует существующим представлениям о корреляции между количеством общего белка и пигментов, образующих белковые комплексы (Дробецкая, 2005).

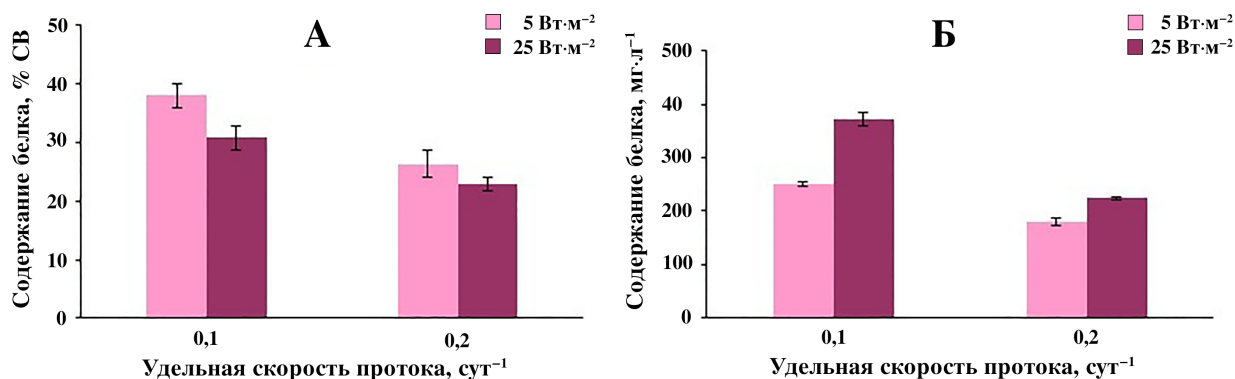


Рис. 3. Содержание белка в биомассе (А) и культуре *P. purpureum* (Б) при различной освещённости
Fig. 3. Protein content in *P. purpureum* biomass (А) and culture (Б) under different irradiance conditions

На основании полученных экспериментальных данных показано, что повышение удельной освещённости клеток (с 7 до 26 Вт·г⁻¹) оказывало значительное влияние на продуктивность полупроточной культуры *P. purpureum*, причём изменения продуктивности по биомассе, В-ФЭ и белку носили односторонний характер. Так, продуктивность по биомассе с ростом освещённости увеличилась в 2,6 раза, по В-ФЭ — в 1,8 раза, а по белку — в 1,7 раза (рис. 4).

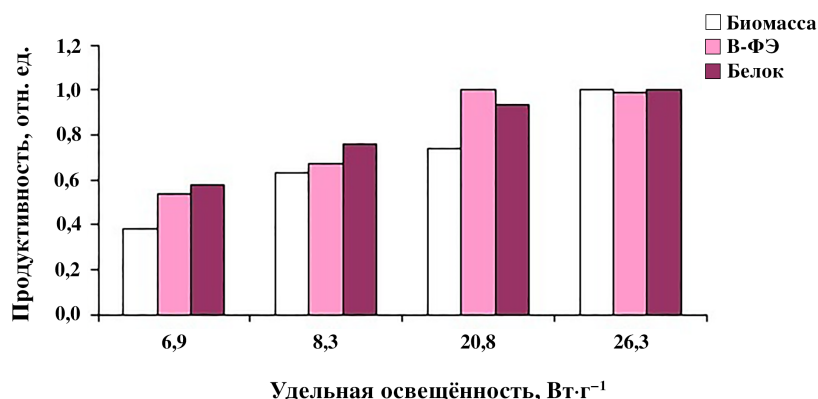


Рис. 4. Зависимость продуктивности полупроточной культуры *P. purpureum*, нормированной по максимальным значениям, от удельной освещённости
Fig. 4. Dependence of *P. purpureum* semi-continuous culture productivity (normalized to maximum values) on specific irradiance

При полупроточном режиме выращивания происходит систематическое внесение биогенных элементов в культуру. С увеличением удельной скорости протока количество вносимого азота и фосфора пропорционально растёт, обеспечивая поддержание клеток в культуре в вегетативном состоянии. Хотя количества биогенных элементов, поступающих в культуру *P. purpureum* при удельной скорости протока среды 0,2 сут⁻¹, было достаточно для обеспечения высокой скорости роста культуры и синтеза В-ФЭ (см. табл. 1), световые условия при заданной в эксперименте освещённости не позволили достигнуть уровня продуктивности по биомассе и В-ФЭ, полученного ранее (0,5 г·л⁻¹·сут⁻¹ и 40 мг·л⁻¹·сут⁻¹ соответственно) (Gudvilovich & Borovkov, 2014). Наибольшие значения продуктивности для условий эксперимента (0,21 г·л⁻¹·сут⁻¹) отмечены для варианта с освещённостью 25 Вт·м⁻² и 20%-ной скоростью

обмена среды, а максимальная продуктивность *P. purpureum* по В-ФЭ ($13 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$) зарегистрирована для вариантов с поверхностной освещённостью $25 \text{ Вт}\cdot\text{м}^{-2}$ ($0,1$ и $0,2 \text{ сут}^{-1}$). С точки зрения эффективности затраченных ресурсов для получения биомассы *P. purpureum*, обогащённой В-ФЭ, оптимальным являлся режим выращивания с поверхностной освещённостью $25 \text{ Вт}\cdot\text{м}^{-2}$ и 10%-ной скоростью обмена среды. Дальнейшее повышение концентрации элементов минерального питания в культуре *P. purpureum* малоэффективно, так как основным фактором, определявшим её продукционные характеристики, являлся световой, что подтверждено полученными экспериментальными данными.

Тем не менее продуктивность *P. purpureum* по В-ФЭ при $25 \text{ Вт}\cdot\text{м}^{-2}$, которая была отмечена в эксперименте, хорошо соотносится с аналогичными значениями продуктивности при сопоставимом уровне суточной облучённости клеток порфиридиума, полученными также в полупроточном режиме (13 и $15 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$ соответственно) (Fabregas et al., 1998). Максимальная продуктивность *P. purpureum*, зарегистрированная в проведённом эксперименте, также была сопоставима с данными, полученными при освещённости в 2 раза выше; продуктивность как по биомассе, так и по В-ФЭ ($0,29$ и $17,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$ соответственно) была близка к экспериментальным данным (Li T. et al., 2019).

Заключение. Определён характер изменения продукционных характеристик полупроточной культуры *P. purpureum* при варьировании удельной скорости роста микроводоросли и поверхностной освещённости. Увеличение освещённости с 5 до $25 \text{ Вт}\cdot\text{м}^{-2}$ вызывало повышение продуктивности культуры как по биомассе, так и по В-фикоэритрину в 1,5–2 раза, а повышение удельной скорости протока среды с $0,1$ до $0,2 \text{ сут}^{-1}$ приводило только к аналогичному возрастанию продуктивности по биомассе. Максимальные значения продуктивности *P. purpureum* по биомассе и В-ФЭ ($0,21 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$ и $13 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$ соответственно) отмечены для варианта эксперимента с освещённостью $25 \text{ Вт}\cdot\text{м}^{-2}$ и 20%-ной скоростью обмена среды. Между тем расчётный уровень продуктивности культуры *P. purpureum*, соответствующий поступающему количеству азота, не зафиксирован ни в одном из вариантов; максимальные значения продуктивности в условиях эксперимента были ниже расчётных в 1,5–2 раза. Содержание белка и В-ФЭ в клетках *P. purpureum* снижалось как с ростом поверхностной освещённости (на 15–20 %), так и с увеличением скорости обмена среды (в 1,5 раза). В целом изменения содержания белка и В-ФЭ в культуре *P. purpureum* имели однонаправленный характер, что соответствует существующим представлениям. Повышение удельной освещённости клеток в эксперименте с 7 до $26 \text{ Вт}\cdot\text{г}^{-1}$ вызывало рост продуктивности по биомассе, В-ФЭ и белку: продуктивность по биомассе увеличивалась в 2,6 раза, по В-ФЭ — в 1,8 раза, а по белку — в 1,7 раза. Таким образом, фотобиосинтез клеток *P. purpureum* определялся уровнем облучённости клеток культуры. При низком уровне поверхностной освещённости основным фактором, обуславливающим продукционные характеристики культуры *P. purpureum*, являлся световой, что нужно учитывать при интенсивном культивировании.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса» (№ гос. регистрации 121030300149-0).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Біохімія червоних водоростей / О. Г. Судьїна, Є. І. Шнюкова, П. О. Мушак, С. І. Лось, Р. М. Фомішина, Н. Д. Тупік, Г. І. Лозова. Київ : Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного, 2007. 320 с. [*Biokhimiia chervonykh vodorostei* / O. H. Sudina, Ye. I. Shniukova, P. O. Mushak, S. I. Los, R. M. Fomishyna, N. D. Tupik, H. I. Lozova. Kyiv : Institut botaniki im. M. G. Kholodnogo, 2007, 320 p. (in Ukr.)]

2. Дробецкая И. В. *Влияние условий минерального питания на рост и химический состав Spirulina platensis (Nordst.) Geitler* : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.17. Севастополь, 2005. 26 с. [Drobetskaya I. V. *Vliyanie uslovii mineral'nogo pitaniya na rost i khimicheskii sostav Spirulina platensis (Nordst.) Geitler* : avtoref. dis. ... kand. biol. nauk : 03.00.17. Sevastopol, 2005, 26 p. (in Russ.)]
3. Маркина Ж. В., Айздайчер Н. А. Влияние меди на численность, морфологию клеток и содержание фотосинтетических пигментов микроводоросли *Porphyridium purpureum* // *Морской биологический журнал*. 2019. Т. 4, № 4. С. 34–40. [Markina Zh. V., Aizdaicher N. A. The effect of copper on the abundance, cell morphology and content of photosynthetic pigments in the microalga *Porphyridium purpureum*. *Morskoy biologicheskij zhurnal*, 2019, vol. 4, no. 4, pp. 34–40. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.21072/mbj.2019.04.4.03>
4. *Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике*. Киев : Наукова думка, 1975. 247 с. [Metody fiziologo-biokhimicheskogo issledovaniya vodoroslei v gidrobiologicheskoi praktike. Kyiv : Naukova dumka, 1975, 247 p. (in Russ.)]
5. Минюк Г. С., Дробецкая И. В., Чубчикова И. Н., Терентьева Н. В. Одноклеточные водоросли как возобновляемый биологический ресурс: обзор // *Морской экологический журнал*. 2008. Т. 7, № 2. С. 5–23. [Minyuk G. S., Drobetskaya I. V., Chubchikova I. N., Terent'eva N. V. Unicellular algae as renewable biological resource: A review. *Morskoy ekologicheskij zhurnal*, 2008, vol. 7, no. 2, pp. 5–23. (in Russ.)]
6. Стадничук И. Н. *Фикобилипротеины*. Москва : ВИНТИ, 1990. 193 с. (Итоги науки и техники. Серия: Биологическая химия ; т. 40). [Stadnichuk I. N. *Fikobiliproteiny*. Moscow : VINITI, 1990, 193 p. (Itogi nauki i tekhniki. Seriya: Biologicheskaya khimiya ; vol. 40). (in Russ.)]
7. Тренкеншу Р. П. Влияние света на макромолекулярный состав микроводорослей в непрерывной культуре невысокой плотности (часть 1) // *Вопросы современной альгологии*. 2017. № 2 (14). [Trenkenshu R. P. Influence of light on macromolecular composition of microalgae in continuous culture of low density (part 1). *Voprosy sovremennoi algologii*, 2017, no. 2 (14). (in Russ.)]. <http://www.algology.ru/1180> [accessed: 02.03.2020].
8. Тренкеншу Р. П., Белянин В. Н. Влияние элементов минерального питания на продуктивность водоросли *Platymonas viridis* Rouch. // *Биология моря*. 1979. Вып. 51. С. 41–46. [Trenkenshu R. P., Belyanin V. N. Effect of mineral nutrients on productivity of *Platymonas viridis* Rouch. *Biologiya morya*, 1979, iss. 51, pp. 41–46. (in Russ.)]
9. Тренкеншу Р. П., Терсков И. А., Сидько Ф. Я. Плотные культуры морских микроводорослей // *Известия Сибирского отделения Академии наук СССР*. 1981. № 5. С. 75–82. (Серия биологических наук ; вып. 1). [Trenkenshu R. P., Terskov I. A., Sid'ko F. Ya. Plotnye kul'tury morskikh mikrovodoroslei. *Izvestiya Sibirskogo otdeleniya Akademii nauk SSSR*, 1981, no. 5, pp. 75–82. (Seriya biologicheskikh nauk ; iss. 1). (in Russ.)]
10. Упитис В. В., Пакалне Д. С., Шульце И. Ф. Оптимизация минерального питания красной морской водоросли *Porphyridium cruentum* // *Известия АН Латвийской ССР*. 1989. Т. 505, № 8. С. 95–104. [Uptitis V. V., Pakalne D. S., Shultse I. F. Optimizatsiya mineral'nogo pitaniya krasnoi morskoi vodorosli *Porphyridium cruentum*. *Izvestiya AN Latvii skoi SSR*, 1989, vol. 505, no. 8, pp. 95–104. (in Russ.)]
11. Цоглин Л. Н., Пронина Н. А. *Биотехнология микроводорослей*. Москва : Научный мир, 2013. 184 с. [Tsoglin L. N., Pronina N. A. *Biotehnologiya mikrovodoroslei*. Moscow : Nauchnyi mir, 2013, 184 p. (in Russ.)]
12. Algarra P., Ruediger W. Acclimation processes in the light harvesting complex of the red alga *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross, according to irradiance and nutrient availability. *Plant, Cell & Environment*, 1993, vol. 16, iss. 2, pp. 149–159. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1993.tb00856.x>
13. Borowitzka M. A. Microalgae as source of pharmaceutical and other biologically active compounds. *Journal of Applied Phycology*, 1995, vol. 7, pp. 3–15. <https://doi.org/10.1007/BF00003544>
14. Fabregas J., Garcia D., Morales E., Dominguez A., Otero A. Renewal rate of semicontinuous cultures of the microalga *Porphyridium cruentum* modifies phycoerythrin, exopolysaccharide and fatty acid productivity. *Journal of Fermentation*

- and *Bioengineering*, 1998, vol. 86, iss. 5, pp. 477–481. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(98\)80155-4](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(98)80155-4)
15. Falkowski P. G., Owens T. G. Light–shade adaptation: Two strategies in marine phytoplankton. *Plant Physiology*, 1980, vol. 66, iss. 4, pp. 592–595. <https://doi.org/10.1104/pp.66.4.592>
 16. Fuentes-Grunewald C., Bayliss C., Zanain M., Pooley C., Scolamacchia M., Silkina A. Evaluation of batch and semi-continuous culture of *Porphyridium purpureum* in a photobioreactor in high latitudes using Fourier transform infrared spectroscopy for monitoring biomass composition and metabolites production. *Biore-source Technology*, 2015, vol. 189, pp. 357–363. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.042>
 17. Gudvilovich I. N., Borovkov A. B. Production characteristics of the microalga *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew Ross (Rhodophyta) in batch and quasi-continuous culture. *International Journal on Algae*, 2014, vol. 16, iss. 3, pp. 271–283. <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v16.i3.70>
 18. John W., Steinbiss J., Zetsche K. Light intensity adaptation of the phycobiliprotein content of the red alga *Porphyridium*. *Planta*, 1984, vol. 16, no. 6, pp. 536–539. <https://doi.org/10.1007/BF00407086>
 19. Kathiresan S., Sarada R., Bhattacharya S., Ravishankar A. Culture media optimization for growth and phycoerythrin production from *Porphyridium purpureum*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, vol. 96, iss. 3, pp. 456–463. <https://doi.org/10.1002/bit.21138>
 20. Li S., Ji L., Shi Q., Wu H., Fan J. Advances in the production of bioactive substances from marine unicellular microalgae *Porphyridium* spp. *Biore-source Technology*, 2019, vol. 292, art. no. 122048 (16 p.). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122048>
 21. Li T., Xu J., Wu H., Jiang P., Chen Z., Xiang W. Growth and biochemical composition of *Porphyridium purpureum* SCS-02 under different nitrogen concentrations. *Marine Drugs*, 2019, vol. 17, iss. 2, art. no. 124 (16 p.). <https://doi.org/10.3390/md17020124>
 22. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, vol. 193, iss. 1, pp. 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
 23. Sosa-Hernández J. E., Rodas-Zuluaga L. I., Castillo-Zacarías C., Rostro-Alanís M., Cruz R., Carrillo-Nieves D., Salinas-Salazar C., Fuentes-Grunewald C., Llewellyn C. A., Olguín E. J., Lovitt R. W., Iqbal H. M. N., Parra-Saldívar R. Light intensity and nitrogen concentration impact on the biomass and phycoerythrin production by *Porphyridium purpureum*. *Marine Drugs*, 2019, vol. 17, iss. 8, pp. 460 (12 p.). <https://doi.org/10.3390/md17080460>
 24. Velea S., Ilie L., Filipescu L. Optimization of *Porphyridium purpureum* culture growth using two variables experimental design: Light and sodium bicarbonate. *UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science*, 2011, vol. 73, no. 4, pp. 81–94.

**PRODUCTION CHARACTERISTICS
OF PORPHYRIDIUM PURPUREUM (BORY) DREW ET ROSS
SEMI-CONTINUOUS CULTURE
AT LOW IRRADIANCE**

**A. B. Borovkov¹, I. N. Gudvilovich¹,
T. M. Novikova¹, and E. V. Klimova²**

¹A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation

²Orel State University named after I. S. Turgenev, Orel, Russian Federation

E-mail: gudirina2008@yandex.ru

The red microalga *Porphyridium purpureum* (Bory de Saint-Vincent, 1797) Drew et Ross, 1965 is of great interest to researchers as a source of various biologically valuable substances, with their content in cells being determined by cultivation conditions. Phycobiliproteins concentration in *P. purpureum* cells depends directly on nitrogen concentration in the culture medium and cell irradiance.

Semi-continuous cultivation allows maintaining these parameters at a level given. The aim of the work was to study *P. purpureum* culture growth and B-phycoerythrin (B-PE) accumulation and production at low irradiance, with minimal rates of pigment photodestruction. *P. purpureum* semi-continuous (quasi-continuous) cultivation was carried out at a specific flow rate of 0.1 and 0.2 day⁻¹ and mean surface irradiance of 5 and 25 W·m⁻². *P. purpureum* culture productivity increased by 1.6–17 times both with a rise in surface irradiance 5 to 25 W·m⁻² and an increase in the medium specific flow rate 0.1 to 0.2 day⁻¹. Maximum productivity values for the experimental conditions (0.21 g·L⁻¹·day⁻¹) were recorded at 25 W·m⁻² and 20 % medium specific flow rate, but those were 1.5–2 times lower than the precalculated ones. In *P. purpureum* cells, protein and B-PE concentrations decreased both with an increase in surface irradiance (by 15–20 %) and with a rise in a specific flow rate (by 1.5 times) for all the variants. The shifts in protein and B-PE concentration in *P. purpureum* culture had a unidirectional character as well; those mainly corresponded to the shift in the culture density. *P. purpureum* B-PE productivity increased by 1.5–1.9 times with a rise in surface irradiance 5 to 25 W·m⁻². Maximum B-PE productivity (13 mg·L⁻¹·day⁻¹) was recorded for the variants of the experiment with a surface irradiance of 25 W·m⁻² (0.1 and 0.2 day⁻¹). An increase in specific irradiance of *P. purpureum* cells 7 to 26 W·g⁻¹ resulted in a rise in biomass productivity by 2.6 times; in B-PE productivity, by 1.8 times; and in protein productivity, by 1.7 times. In the experiment, irradiance was the factor determining the production characteristics of *P. purpureum* culture, and it was confirmed by the data obtained.

Keywords: *Porphyridium purpureum*, culture density, protein, phycobiliproteins, B-phycoerythrin, productivity